

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年9月13日 (13.09.2001)

PCT

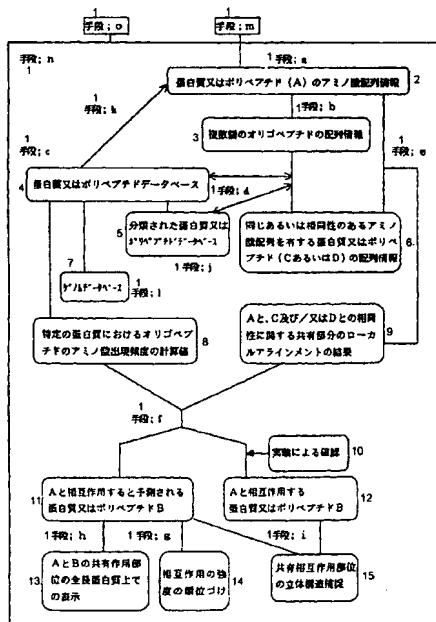
(10) 国際公開番号
WO 01/67299 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G06F 17/30, C07K 7/06, 14/435, G01N 33/68 [JP/JP]; 〒211-8588 神奈川県川崎市中原区上小田中4丁目1番1号 Kanagawa (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/01846 (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 土居洋文 (DOI, Hirofumi) [JP/JP]; 〒273-0865 千葉県船橋市夏見五丁目29番4-515号 Chiba (JP). 鈴木 敦 (SUZUKI, Atsushi) [JP/JP]; 〒134-8630 東京都江戸川区北葛西一丁目16番13号 第一製薬株式会社 東京研究開発センター内 Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2001年3月9日 (09.03.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2000-72485 2000年3月10日 (10.03.2000) JP (74) 代理人: 庄司 隆, 外(SHOJI, Takashi et al.); 〒101-0032 東京都千代田区岩本町3丁目2番10号 SN岩本町ビル6階 Tokyo (JP).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 第一製薬株式会社 (DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8234 東京都中央区日本橋3丁目14番10号 Tokyo (JP). 富士通株式会社 (FUJITSU LIMITED) (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF ANTICIPATING INTERACTION BETWEEN PROTEINS

(54) 発明の名称: 蛋白質間相互作用予測方法



- 1... MEANS
- 2... AMINO ACID SEQUENCE DATA OF PROTEIN OR POLYPEPTIDE (A)
- 3... SEQUENCE DATA OF PLURAL OLIGOPEPTIDES
- 4... PROTEIN OR POLYPEPTIDE DATA BASE
- 5... CLASSIFIED PROTEIN OR POLYPEPTIDE DATA BASE
- 6... SEQUENCE DATA OF PROTEIN OR POLYPEPTIDE (C OR D) HAVING THE SAME OR HOMOLOGOUS AMINO ACID SEQUENCE
- 7... GENOME DATA BASE
- 8... CALCULATED AMINO ACID APPEARANCE FREQUENCIES OF OLIGOPEPTIDES IN SPECIFIC PROTEIN
- 9... RESULTS OF LOCAL ALIGNMENT OF PARTS COMMON TO A AND C AND/OR D CONCERNING HOMOLOGY
- 10... CONFIRMATION BY EXPERIMENT
- 11... PROTEIN OR POLYPEPTIDE B ANTICIPATED AS INTERACTING WITH A
- 12... PROTEIN OR POLYPEPTIDE B INTERACTING WITH A
- 13... INDICATION OF ACTION SITES COMMON TO A AND B ON FULL-LENGTH PROTEIN
- 14... INTERACTION STRENGTH RANKING
- 15... CERTIFICATION OF STERIC STRUCTURE OF COMMON INTERACTION SITES

(57) Abstract: A method of anticipating an interaction between proteins characterized by comprising: (1) digesting the amino acid sequence of a protein A to give oligopeptides of certain length; (2) searching for a protein C having the above-described oligopeptides or a protein D having oligopeptides homologous with the above-described oligopeptides from a protein data base; (3) performing local alignment between the above-described protein A and the protein C or D thus detected; and (4) anticipating that the detected protein C or D is

[続葉有]

特集 細胞の生と死の制御機構の多様性

REVIEW

カスパーゼ非依存的細胞死 ——アポトーシスとは異なるプログラム細胞死の存在

プログラム細胞死は必ずしもアポトーシスの形態を示しカスパーゼ依存的であるとは限らない。本稿ではプログラム細胞死の形態や制御機構の多様性に焦点を当て、その医学研究における意義について解説する。

Key words : Ras, type 2 cell death, autophagic degeneration, caspase-independent, non-apoptotic

はじめに

ヒトを含め動物細胞は一般に自らを死に至らしめるための機能を内蔵しており、そのような機能の活性化の結果起こる自律的な細胞死 (autonomic cell death, active cell death, cell suicide) は組織中で不要あるいは有害になった細胞を排除することにより、正常な発生や成体の恒常性維持に貢献している。このことは自律的細胞死の制御異常が疾患の発原因となりうることを意味しているが、事実細胞死の制御異常が種々の疾患の基礎となっていることが明らかになってきており、細胞死研究は今日の医学研究において重要なウエイトを占めるようになっている。さて、今後さらに重要性を増してくると考えられる細胞死研究ではあるが、現在はアポトーシスの研究に終始しているといっても過言ではない。確かにアポトーシスは生体内で起きている重要な自律的細胞死であることから、アポトーシスの研究を行うこと自体はきわめて有意義なことである。しかしながら、細胞死研究の対象としてアポトーシスしか念頭においていない現状は果たしてこのままでよいのだろうか。もしアポトーシス以外の自律的な細胞死が生体内で機能しているとすれば、「アポトーシス」という言葉だけにとらわれた医学研究は大切なものを見逃してしまう危険性をはらんでいるこ

とになる。本稿では最近急増しつつある自律的細胞死の多様性を示唆する報告を紹介するとともに、アポトーシス以外の自律的細胞死の医学研究における重要性について述べ、今後の細胞死研究の一つの方向性を呈示したい。

Ⅰ プログラム細胞死とアポトーシス

本論に入る前にまず、「アポトーシス」や「プログラム細胞死」といった細胞死研究におけるキーワードについて確認をしておきたい。というのも、これらのキーワードの用法の不的確さが概念の混乱につながっており、ひいては細胞死研究の方向性にまで影響を及ぼしかねないからである。まず、アポトーシスについては、病理学者である Kerr らが電子顕微鏡レベルでさまざまな細胞死を観察する過程で一連の特徴的な形態学的変化 (細胞質・核の濃縮・断片化、周辺細胞による迅速な取り込み、散発的・孤立的な発生) を示す細胞死を見だし、このような細胞死を apoptosis (アポトーシス) と命名している¹⁾。したがって、アポトーシスの本来の定義は形態学的なものであり、基本的には上記のような形態学的特徴を示す細胞死に対して用いる呼称である。これに対して「プログラム細胞死」ということばは本来機能的なものである。この用語はアポトーシスという用語に先駆けて 1965 年に Lockshin らが蛾

Caspase-independent programmed cell death : Diversity of cell death programs

北中千史
口野嘉幸

Chifumi Kitanaka 専門：細胞死の分子生物学，脳神経外科
趣味：スキー，ゴルフ
Yoshiyuki Kuchino 専門：分子生物学
国立がんセンター研究所生物物理部
(中央区築地 5-1-1 〒104-0045)

(カイコ)の変態過程で起こる intersegmental muscle の細胞変性をさして用いており，そのオリジナルな意味は一定の時期・一定の部位に再現性よく起こる「予定された細胞死」(developmentally programmed cell death) ということになる²⁾。

このような「予定された細胞死」は広い意味においてはすべて遺伝子レベルで制御されていると考えられるが，そのような遺伝子レベルでの制御が死にゆく細胞の内部にあるもの，すなわち細胞に内在する遺伝子プログラムによって制御される細胞死 (cell death regulated by intrinsic genetic program) を特にさして用いられる場合があり，最近ではむしろこの意味で用いられることが多いようである。このように「プログラム細胞死」には大きく2つの用法があるが，われわれ医学研究者が対象にしようとする自律的細胞死はまさに後者の「プログラム細胞死」と同じ意味になるので，以降は特に断わらない限りこの意味でプログラム細胞死という用語を用いることとする。

さて，アポトーシスを命名した Kerr らが優れていた点は，状況証拠のみをもとにアポトーシス (の形態学的特徴を示す細胞死) が「発生過程や成体の恒常性維持に貢献する遺伝子レベルで制御された自律的細胞死」すなわちプログラム細胞死であることを見抜いていたところにあり，このような予測 (アポトーシスはプログラム細胞死である) は後に多くの実験事実により裏づけられ今や定説となっている。しかしながら，アポトーシス研究が加熱するにつれていつしかこの原点が忘れ去られるようになり，言

葉だけが一人歩きし始めた結果，いつのまにか「プログラム細胞死はアポトーシスである」という誤解が一般的になりつつある³⁾。ここでネクローシスという用語にも触れておくが，この用語は病理学において非常に古くから用いられてきたもので，本来死細胞の終末的な状態 (形態) を包括的に意味するものであり，どのような死に方をしたかは基本的に問わない。一方，Wyllie らがアポトーシスの概念と対立するものとしてネクローシスを取り上げ，形態学的に核や細胞質の濃縮を伴わずむしろ細胞の膨化と細胞膜の破綻を特徴とするものと定義し，かつこのような細胞死は大部分がプログラムされない受動的な細胞死であるとしたため⁴⁾，現在では細胞死研究者のほとんどがこのような意味でネクローシスという言葉を用いているようである。しかしながら，最近このような用語の混乱に対して特に毒物病理学研究者らから本来の正しい意味で用いるべき，との提唱がなされており (たとえばアポトーシスで死んだ細胞は apoptotic necrosis と表現することになる)⁵⁾，今後の検討 (用語の統一) が必要である。われわれも暫定的に「ネクローシス様」という用語を用いることがあるが，この場合は Wyllie らの定義したネクローシスの形態学的特徴をもつ細胞死をさしているが，その細胞死が自律的なものか受動的なものかはまったく考慮に入れていない。



アポトーシスとは異なるプログラム細胞死

さて，ことばの定義上はプログラム細胞死とアポ

***1 自食作用** ——
自食作用 (autophagy) とは細胞が自らの構成成分をリソソームで分解する機構である。細胞質成分あるいは細胞内小器官が膜により取り囲まれることにより自食小胞 (autophagosome) が形成され、こ

れがリソソームと融合し自食リソソーム (autophagolysosome) となる。

***2 タイプ2 細胞死のみられる部位** ——
マウスやラットの胎生期では軟口蓋や大動脈管の閉鎖時、腸小窩の形成時、中腎、耳胞などにおいてみられることが報告されている。

表1 生理的細胞死の形態学的特徴に基づく分類

	タイプ1 (apoptosis)	タイプ2 (autophagic degeneration)	タイプ3 (non-lysosomal disintegration)
核	核の凝縮	時にピクノシスがみられるが顕著ではない	後期に崩壊
細胞質	顕著なピクノシス容積の減少	多数の自食空胞	全般的な崩壊、細胞内小器官の拡張
終末像	断片化し、周辺細胞による貪食を介して迅速に処理される	断片化し、後に周辺細胞により貪食処理されることもある	非常に細かい断片に断片化し、周辺細胞による貪食処理はみられない
頻度、部位	しばしばみられる細胞死のタイプで、孤立した状態で起こることが多い	しばしばみられる細胞死のタイプで、細胞がまとまって脱落する状況で起こることが多い	まれ、空胞化軟骨細胞でのみ確認されている

この表は Schweichel JU et al: *Teratology* 7, 253, 1973⁶⁾; Clarke PG: *Anat Embryol* 181, 195, 1990⁷⁾; Zakeri Z et al: *Cell Death Differ* 2, 87, 1995⁸⁾ に基づき、生理的細胞死の3つのタイプの特徴的所見をまとめたものである。

トーシスはまったく別のものであり、プログラム細胞死は必ずしもアポトーシスではないということはおわかりいただけたと思うが、現実問題としてアポトーシス以外のプログラム細胞死は存在するのだろうか。実は Kerr らとほぼ同じ頃まったく別のグループ (Schweichel & Merker)⁶⁾ がやはり電子顕微鏡を用いて齧歯類の発生過程で起こるさまざまな生理的細胞死を観察しており、そのような細胞死はおよそ3種類に分類できることを明らかにしている (表1)。1つ目のタイプ (タイプ1) の細胞死は常に孤立した状態で起きており、早期より核と細胞質の縮小を特徴とするものであった。死細胞は次いで断片化し周囲の細胞により貪食される。このタイプ1細胞死は明らかに Kerr らのいうアポトーシスと同一のものと考えられる。2つ目のタイプ (タイプ2) の細胞死は細胞質における自食リソソーム・空

胞^{*1}の早期出現を特徴とするものであり、死細胞は後に断片化し、周囲の細胞により貪食される。このタイプの細胞死は細胞がまとまって脱落するような状況で認められた^{*2}。3つ目のタイプ (タイプ3) はミトコンドリアなどの細胞内小器官の空胞化に始まり、次いで非常に細かい断片への断片化がみられたが、リソソームの関与はなく周辺細胞の反応もみられなかった。このタイプの細胞死は空胞化軟骨細胞において認められた。この Schweichel と Merker⁶⁾ により提唱された分類の妥当性は、その後 Clarke⁷⁾ や Zakeri ら⁸⁾ の

総説においても確認されている。すなわち、Schweichel と Merker の分類によるタイプ1~3の細胞死はいずれも確かに動物の正常な発生過程において認められており、なかでも核変化に乏しく自食空胞の出現を特徴とするタイプ2細胞死は、アポトーシスであるタイプ1細胞死と同様に無脊椎動物から哺乳動物に至るまで幅広く認められている。

以上のような観察所見から、一見ネクローシス様の形態を示す生理的な細胞死が動物の生体内で起きていることは疑いようのない事実であり、またこれらの細胞死が発生過程における一定の時期、一定の部位に再現性よく出現していることから、少なくとも広い意味においては遺伝子レベルで制御されたプログラム細胞死であることもまず間違いないと考えられる。しかしながら細胞死の制御機構が本質的に死細胞の内部にある (自律的) か外部にある (受動

受動的な「予定細胞死」——
たとえば1本の血管に栄養される領域の細胞は、仮にこの血管の内皮細胞が一定の時期に「自律的細胞死」を起こして血管が閉塞すると、血管閉塞に引き続く一定の時期に「予定された細胞死」に陥る

ことになる。しかし虚血によるこの「予定細胞死」は血管内皮のそれとは異なり「自律的細胞死」ではない(遺伝子レベルでの制御は内皮細胞内に存在し、虚血で死にゆく細胞のなかにはない)。

的) かということとはまた別の問題であり⁹⁾、今までのところタイプ2, 3の細胞死が細胞内に存在する遺伝子プログラムにより制御される自律的なプログラム細胞死であるという確証は得られていない。これは、アポトーシスの場合とは対照的にこれらの細胞死の分子機構を解析するうえで有用なモデル実験系が確立されていなかったことが大きな要因となっている。

細胞死プログラムの多様性—カスパーゼに依存するもの、しないもの

プログラム細胞死の概念がアポトーシスのそれよりも以前から存在し、かつまたプログラム細胞死が多様な形態をとりうる可能性が指摘されていたにもかかわらず、なぜアポトーシスだけがこれほどまでに注目されるようになったのか。これは細胞死が死にゆく運命にある細胞自身の遺伝子プログラムにより自律的に制御されていることを証明した先駆的研究において、モデル実験系として用いられた線虫のプログラム細胞死がアポトーシスであったことが一つの大きな要因と考えられる。線虫 *Caenorhabditis elegans* ではその発生過程において特定の細胞が特定の時期に細胞死によって除去されることが知られており、遺伝学的な解析の結果からこのようなアポトーシスによるプログラム細胞死に必要とされるいくつかの遺伝子 (*ced=cell death abnormal*) が見いだされた⁹⁾。さらにこれら線虫のプログラム細胞死の制御にかかわる遺伝子に対応する哺乳動物の遺伝子の存在が次々と明らかとなり、線虫から哺乳動物に至るまでアポトーシスによるプログラム細胞死の根本的な制御メカニズムが解明されることとなった¹⁰⁾。このようにプログラム細胞死の研

究はまさにアポトーシスを題材として一気に展開してきたわけで、その過程でプログラム細胞死すなわちアポトーシスと受け止められるようになったのも無理からぬところである。

しかしながらここに来て、急速にアポトーシス以外のプログラム細胞死が注目されるようになってきた。線虫 *C. elegans* のすべてのプログラム細胞死の実行に必要とされる遺伝子 *ced-3* のコードするタンパク質はカスパーゼとよばれる哺乳動物のシステインプロテアーゼファミリーに相同性を示す^{10,11)}。カスパーゼに関する当初の研究結果はカスパーゼがアポトーシスに伴って活性化されること、カスパーゼ活性の抑制によりアポトーシスによる細胞死が抑制されることを示しており、このプロテアーゼファミリーが哺乳動物のアポトーシスにおいても中心的な役割を果たしているという考え方を支持するものであった¹¹⁾。その結果、一時はこれでアポトーシス、ひいてはプログラム細胞死の実行機構の大枠は解明されたのではないかと考えられるようになった。ところが最近になってカスパーゼの活性を抑制した状態でもプログラム細胞死そのものは抑制されないという実験事実が続々と報告されるようになり、いやがうえにもアポトーシスとは異なった実行機構をもつプログラム細胞死の存在を想定せざるをえない状況となってきたのである^{12,13)}。

このようなカスパーゼ非依存的プログラム細胞死の最初の報告例はおそらく Bax による細胞死であろう。Xiang ら¹⁴⁾ は、Bax がヒト白血病 Jurkat 細胞にカスパーゼの活性化とアポトーシスの形態を伴った細胞死を誘導するにもかかわらず、カスパーゼの活性抑制はクロマチン凝集などのアポトーシスに特徴的な形態的变化を抑制するのみで細胞は顕著

な空胞化を起こし、細胞死そのものは抑制されないことを示した。同様に McCarthy ら¹⁵⁾は Bak, c-Myc, E1A などの遺伝子産物はカスパーゼの活性化を伴った典型的なアポトーシスを誘導するにもかかわらず、広域カスパーゼ阻害剤の存在下でもなお細胞死が誘導され、その際細胞質の空胞化が認められ、クロマチンの凝集はごく軽度であった、と報告している。しかしながらカスパーゼ阻害剤とは対照的に培地中に IGF-1 (insulin-like growth factor-1) を加えたり、細胞内に Bcl-2 を発現させたりすれば細胞死自体が抑制されることから、このカスパーゼ非依存的細胞死は明らかに細胞内の生存シグナルによって制御可能なプログラム細胞死であると考えられる。これらのほかにも *in vitro* の実験系において数多くの同様の報告がなされているが、*in vitro* の実験系の結果のみではこのような所見の生理的な意義に疑問が残るところである。

しかしながら同様な現象が生体内でも認められることが最近明らかになった。哺乳動物の発生過程における interdigital web (水掻き) の消失は形態形成におけるプログラム細胞死の役割を示す典型的なモデルとしてよく知られている。線虫の CED-4 に対応する基本的なアポトーシス制御因子である Apaf-1 は哺乳動物細胞においてミトコンドリアを経由するアポトーシスシグナルをカスパーゼの活性化へと伝える重要な役割を果たしていることから、*Apaf-1* のノックアウトマウスでは発生段階で起こるアポトーシスが一部障害されており、水掻きにおいても形態学 (電子顕微鏡レベル) 的にも生化学 (TUNEL アッセイ) 的にもアポトーシスが起きなくなっていることが確認されている。しかしながら驚いたことに *Apaf-1* ノックアウトマウスの水掻きは若干の遅れはあるものの完全に消失し正常な指が形成されており、アポトーシスが起きなくても水

掻きの消失に必要なプログラム細胞死は完全に遂行されることが判明した。そしてこのとき水掻きの部位で認められる細胞死は核変化に乏しく細胞質の空胞化を伴った細胞死であった¹⁶⁾。このように、アポトーシスの形態を示し明らかに遺伝子プログラムにより自律的に制御されていると考えられるプログラム細胞死のなかにはカスパーゼの活性化を抑制してもアポトーシス形態のみが阻害され細胞死そのものは抑制されないものが確かに存在する。そしてこのことはアポトーシスとは形態ならびに実行機構を異にする (カスパーゼ非依存的) 細胞死プログラムの存在を意味しているとともに、そのような細胞死プログラムがカスパーゼ依存的なアポトーシスの細胞死プログラムと同時に活性化されていることを示している。

さて、これらのカスパーゼ非依存的なプログラム細胞死の例はいずれももともとはアポトーシスプログラムの活性化を伴っているものであり、人為的にアポトーシスを抑制した状態ではじめて明らかになったものであるが、本来的にネクロシス様の形態を示すプログラム細胞死の例も知られている。その代表例は TNF- α (tumor necrosis factor- α) によるプログラム細胞死であろう。TNF- α は細胞の種類によってはアポトーシスとは異なった形態 (核の濃縮を伴わず、細胞の膨化や細胞膜の破綻を特徴とする) を示す細胞死を誘導することが古くから知られているが、この TNF- α による細胞死も TNF レセプターから活性酸素生成に至る細胞内シグナル伝達経路を介して制御されるプログラム細胞死である¹⁷⁾。このような細胞死の制御機構がどのようになっているか興味のあるところであったが、最近になってこの TNF- α により誘導される非アポトーシス性のプログラム細胞死のシグナル伝達にはやはりカスパーゼが関与していないことが示され

た¹⁸⁾。

IV Ras シグナル伝達因子により制御されるカスパーゼ非依存的・非アポトーシス性プログラム細胞死

これまでの説明から、プログラム細胞死にはアポトーシスの形態学的特徴をもつものとそうでないもの（非アポトーシス性プログラム細胞死）があること、プログラム細胞死を実行する「細胞死プログラム」にもカスパーゼ依存的なもの（カスパーゼ依存的プログラム細胞死）と非依存的なもの（カスパーゼ非依存的プログラム細胞死）が存在することをご理解いただけたと思う。すると次の段階において大切なことは、このようなカスパーゼ非依存的・非アポトーシス性プログラム細胞死がどのような分子機構で制御されているかを明らかにすることである。特に生理的意義を考えると、生体内でしばしば認められているタイプ2細胞死（autophagic degeneration）が遺伝子レベルで制御される自律的な細胞死であること（先に述べたようにこれ自体がまだはっきりと示されていない）、そしてそれがどのような遺伝子によって制御されているのかを明らかにすることはきわめて重要になってくる。このようななか筆者らはRasシグナル伝達経路がタイプ2細胞死の制御にかかわっていることを初めて見いだしたので以下に紹介する¹⁹⁾。

悪性神経膠腫（グリオーマ）では他の多くのヒト腫瘍で高頻度に

認められる癌遺伝子産物 Ras の変異がきわめてまれであることが知られているが、筆者らはこれは変異により活性化された Ras がグリオーマ細胞の生存や増殖に対してはむしろ抑制的に機能するためではないかと考えた。そこでテトラサイクリン除去により活性型 Ras (RasV12) を発現誘導できるグリオーマ細胞を作製し、活性型 Ras の発現を誘導したところ細胞質の空胞出現を伴った細胞死が誘導されることが確認された。図1は活性型 Ras によりグリオーマ細胞に誘導される細胞死の形態変化を位相差顕微鏡下で経時的に観察したものであり、細胞変性の初期には核形態は保たれており、核周囲に顆

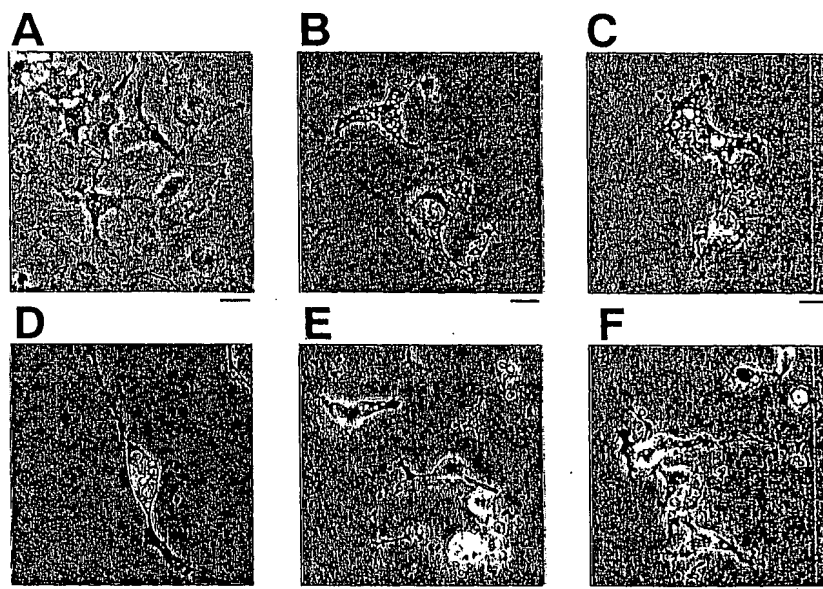


図1 U251 ヒトグリオーマ細胞において Ras シグナル伝達経路活性化により誘導される細胞死の位相差顕微鏡像

U251TA-RasV12 細胞は培地からテトラサイクリンを除去することにより活性型 H-Ras (RasV12) の発現を誘導できる U251 の安定遺伝子導入株である。A: U251TA-RasV12 細胞をテトラサイクリン存在下で培養（活性型 Ras の発現は抑制されている）。B～F: U251TA-RasV12 細胞をテトラサイクリン非存在下で培養（活性型 Ras の発現が誘導される）。B は 2 日間、C は 3 日間、D～F は 4 日間培養後の状態。scale bar = 25 μ m。

(Kitanaka C et al: Cell Death Differ 6, 508, 1999¹²⁾ より)

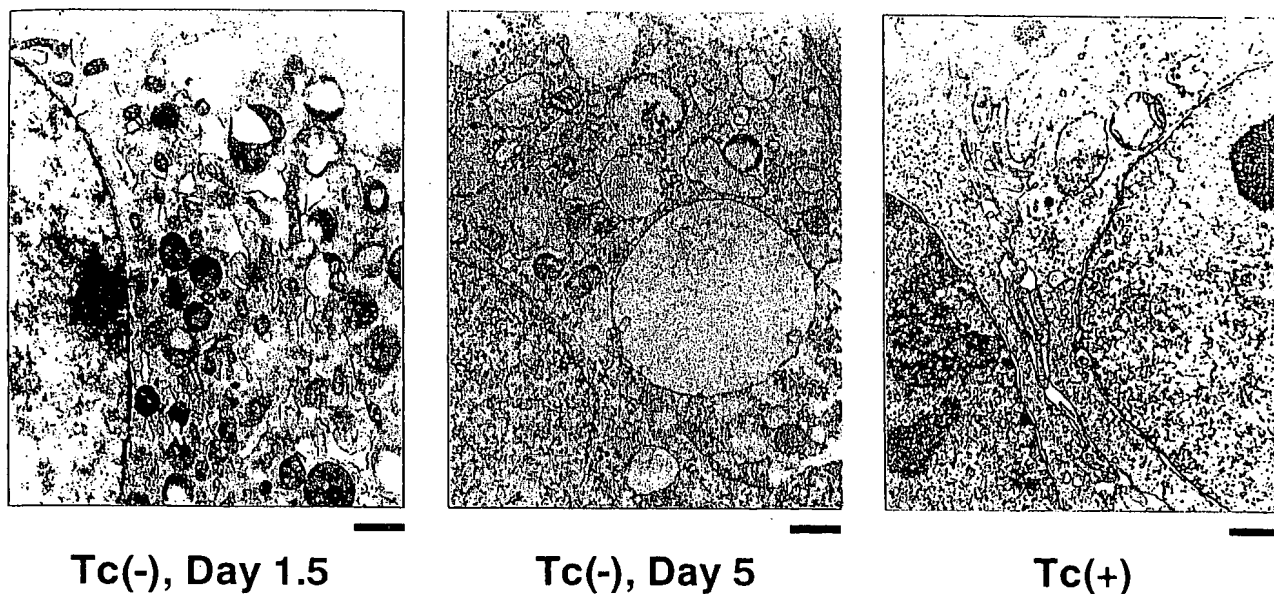


図3 Ras誘導細胞死の透過電子顕微鏡像(強拡大)

U251TA-RasV12細胞をテトラサイクリン非存在下で1.5日間(Tc(-), Day 1.5)あるいは5日間(Tc(-), Day 5)培養した。Tc(+)はU251TA-RasV12細胞をテトラサイクリン存在下で培養したもの。scale bar=1 μ m。

(Kitanaka C et al : *Cell Death Differ* 6, 508, 1999¹²⁾より)

とは本質的に異なっていること、そしてRasシグナル伝達系がタイプ2細胞死の制御に関与していることなどを示唆するものである。

V

プログラム細胞死の多様性に対する認識の重要性

以上紹介したように、非アポトーシス性プログラム細胞死、カスパーゼ非依存的細胞死プログラムの存在が明らかになり、その分子機構の解明も始まりつつある。最後にこのような細胞死(研究)の医学的意義について論じ、まとめたい。これほどまでに医学関係者がプログラム細胞死(アポトーシス?)研究に強い関心を抱くのは多くの疾患の発生にプログラム細胞死(細胞自殺機構)の異常がかかわっていると考えられているからである。それと同

時に細胞の自殺機構の異常が問題なのであれば、そのメカニズムを解明することにより治療法の開発が期待できるからである。それでは、たとえば過剰なプログラム細胞死が原因と考えられている疾患において実際にはどのような細胞死がみられるのであろうか。すべてアポトーシスで説明がつくのであろうか。神経変性疾患は過剰なプログラム細胞死が原因となる疾患の代表例としてよく取り上げられているが、そのなかでも中心的存在であるAlzheimer病についてみると、Alzheimer病の原因とされるアミロイド β タンパク質は確かに*in vitro*の実験系においてアポトーシスを誘導することができるが、細胞の種類が変わると細胞死の形態は必ずしもアポトーシスの特徴を示さない²⁰⁾。そこで重要となってくるのは実際の患者脳で起きている細胞死がど

** 顆粒空胞変性

Alzheimer 原線維変化, 老人斑とならぶ老年性神経病理学的変化の三主徴の一つである。主に海馬錐体細胞の胞体内に1個から数個の円形透明な空胞が認められ、内部に1個の顆粒状構造物を認める。正

常老人でもある程度認められるが, Alzheimer 病など痴呆老人脳では著しく頻度が増す。

のようなものであるかを検討することであるが, Alzheimer 病に伴って起こる神経細胞の変性所見は病理組織学的には顆粒空胞変性として古くから知られており²¹⁾, アポトーシスとは明らかに異なったものである²¹⁾。興味深いことに顆粒空胞変性でみられる顆粒・空胞は自食小胞・リソソームに由来することが指摘されており²²⁾, Alzheimer 病の神経細胞変性はむしろタイプ2細胞死 (autophagic degeneration) によるものである可能性が考えられる。もしそうだとすると, アポトーシス誘導モデルを用いて得られた *in vitro* での実験結果は Alzheimer 病の臨床にフィードバックできなくなる危険性をはらんでおり, この点については Alzheimer 病研究の専門家も警鐘をならしているところである²³⁾。このような例は Alzheimer 病に限らず, Alzheimer 病と並ぶ代表的な神経変性疾患である Parkinson 病でも患者脳の組織学的検索の結果, 変性神経細胞はアポトーシスの像のみならず autophagic degeneration (タイプ2) 細胞死の像も示すことが明らかになっている²⁴⁾。さらに筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) の疾患モデルマウスの解剖所見では, 変性神経細胞は細胞質の空胞化を伴い核変化に乏しいなど形態学的にもアポトーシスとは異なっており, TUNEL 陰性, カスパーゼ3の活性化を伴わないなど, カスパーゼ非依存的細胞死であることも示唆された²⁵⁾。このほか, 伸長したポリグルタミン鎖をもつアタキシン3はポリグルタミン病である脊髄小脳変性症タイプ3の原因因子と考えられているが, これを培養神経細胞内で発現させたところ細胞質の空胞化を伴い, 明らかにネクローシス様形態の細胞死が誘導されることも最近報告されている²⁶⁾。

このように少なくともいくつかの神経変性疾患ではアポトーシスとは異なるプログラム細胞死 (必ずしもすべてがプログラム細胞死ではないのかもしれない) の関与が強く示唆されており, アポトーシス研究のみではその本質にせまることは難しいであろう。

一方, 癌はプログラム細胞死が不必要に抑制された結果生じる疾患の代表であり, 本来なら細胞死プログラムの活性化により排除されるべき前癌状態の細胞が細胞死を免れることにより生じると考えられている。したがって癌細胞のもつ細胞死プログラムを活性化することができればそれが最も直接的な治療法と考えられ, そのため癌細胞にアポトーシスを誘導することにより癌を治療する試みが続けられてきた。しかしながら癌はしばしばアポトーシス耐性を獲得した選りすぐりの細胞からなっていることもまたよく知られた事実である。このような観点からすると, もし癌細胞がアポトーシス以外の細胞死のプログラムも併せもっていれば, そのような細胞死プログラムの活性化はアポトーシス誘導に依存してきたこれまでの治療法を補完する新たな治療法として非常に期待される。先に紹介した活性型 Ras により誘導される非アポトーシス性プログラム細胞死は TNF- α によるアポトーシスを抑制できるレベルの Bcl-2 の高発現によっても抑制されないことが明らかとなっているので¹⁹⁾, このようなプログラム細胞死の制御機構を解明・応用することにより癌治療の新境地を切り開くことができるかもしれない。

以上のように, 単にアポトーシスという観点からではなく「多様性をもったプログラム細胞死」という観点から改めて疾患を見つめ直してみることであり, 今まで見えてこなかったものが見えてくること

がおわかりいただけたであろう。今後プログラム細胞死の制御異常が関与する疾患を分子レベルで理解し、治療法を開発してゆくためには、アポトーシスのみならず非アポトーシス性・カスパーゼ非依存的プログラム細胞死の分子機構の解明が重要であるこ

とは言を待たないが、この分野の発展はどれだけ多くの医学研究者がプログラム細胞死の多様性を認識できるかにかかっているといっても過言ではないであろう。

文献

- 1) Kerr JF, Wyllie AH & Currie AR. Apoptosis : A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239 (1972)
- 2) Lockshin RA & Williams CM. Programmed cell death. I : Cytology of the degeneration of the intersegmental muscles of the Pernyi silkworm. *J Insect Physiol* 11, 123 (1965)
- 3) Schwartz LM. The faces of death. *Cell Death Differ* 2, 83 (1995)
- 4) Wyllie AH, Kerr JF & Currie AR. Cell death : The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251 (1980)
- 5) Levin S, Bucci TJ, Cohen SM et al. The nomenclature of cell death : Recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. *Toxicol Pathol* 27, 484 (1999)
- 6) Schweichel JU & Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7, 253 (1973)
- 7) Clarke PG. Developmental cell death : Morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 181, 195 (1990)
- 8) Zakeri Z, Bursch W, Tenniswood M & Lockshin RA. Cell death : Programmed, apoptosis, necrosis or other ? *Cell Death Differ* 2, 87 (1995)
- 9) Ellis RE, Yuan JY & Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 7, 663 (1991)
- 10) Wilson MR. Apoptosis : Unmasking the executioner. *Cell Death Differ* 5, 646 (1998)
- 11) Kumar S & Lavin MF. The ICE family of cysteine proteases as effectors of cell death. *Cell Death Differ* 3, 255 (1996)
- 12) Kitanaka C & Kuchino Y. Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ* 6, 508 (1999)
- 13) 北中千史, 口野嘉幸. ネクローシス様形態を示すカスパーゼ非依存的プログラム細胞死. 蛋白質 核酸 酵素 44, 253 (1999)
- 14) Xiang J, Chao DT & Korsmeyer SJ. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 14559 (1996)
- 15) McCarthy NJ, Whyte MK, Gilbert CS & Evan GI. Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J Cell Biol* 136, 215 (1997)

- 16) Chautan M, Chazal G, Cecconi F, Gruss P & Golstein P. Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr Biol* 9, 967 (1999)
- 17) Schulze-Osthoff K, Krammer PH & Droge W. Divergent signalling via APO-1/Fas and the TNF receptor, two homologous molecules involved in physiological cell death. *EMBO J* 13, 4587 (1994)
- 18) Vercammen D, Beyaert R, Denecker G et al. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 187, 1477 (1998)
- 19) Chi S, Kitanaka C, Noguchi K et al. Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells. *Oncogene* 18, 2281 (1999)
- 20) Gschwind M & Huber G. Apoptotic cell death induced by beta-amyloid 1-42 peptide is cell type dependent. *J Neurochem* 65, 292 (1995)
- 21) Tomlinson BE & Kitchener D. Granulovacuolar degeneration of hippocampal pyramidal cells. *J Pathol* 106, 165 (1972)
- 22) Okamoto K, Hirai S, Iizuka T, Yanagisawa T & Watanabe M. Reexamination of granulovacuolar degeneration. *Acta Neuropathol* 82, 340 (1991)
- 23) Haass C. Dead end for neurodegeneration? *Nature* 399, 204 (1999)
- 24) Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F et al. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol* 12, 25 (1997)
- 25) Migheli A, Atzori C, Piva R et al. Lack of apoptosis in mice with ALS. *Nat Med* 5, 966 (1999)
- 26) Evert BO, Wullner U, Schulz JB et al. High level expression of expanded full-length ataxin-3 *in vitro* causes cell death and formation of intranuclear inclusions in neuronal cells. *Hum Mol Genet* 8, 1169 (1999)